

УДК 616.65-018-06:504.5

**Abstract****Shkrioba A.O.***Sumy State University,**2, Rymkogo-Korsakova St., Sumy,  
40007, Ukraine***TRACE ELEMENTS INFLUENCE ON PROSTATE NEURO-  
ENDOCRINE CELLS MORPHOGENESIS**

**Introduction.** There have been a few studies on neuroendocrine system of a prostate in comparison with the studies on NE-cells in other organs until recently. The quantity of published works has increased substantially within the recent years due to the development of immunocytochemical methods, though studies on prostate neuroendocrine system are still at the very beginning. The paper focuses on morphological peculiarities of neuroendocrine cells of the prostate gland under conditions of exposure to heavy metal salts.

**Purpose.** The purpose of the present work lied in the study of neuroendocrine cells, that secreted chromogranin A, of a prostate of rats under conditions of the influence of heavy metal salts.

**Materials and Methods.** The experiment was performed in 48 pedigreeless sexually mature (6 months) rats. Morphological peculiarities of neuroendocrine cells, immunoreactive to chromogranin A, of the prostate gland have been studied using immunohistochemical methods.

**Discussion.** In the result of the held immunohistochemical research it has been demonstrated that under the impact of heavy metal salts the increase of the number of a population of neuroendocrine cells that secreted chromogranin, was observed in the tissue of the prostate gland of experimental rats. The area of expression of chromogranin A increased in the tissue of the prostate in all animals during the whole experiment, and it was significantly higher compared to a control group. This research confirms the protective, adaptive and compensatory nature of the adjustment of neuroendocrine system of a prostate of rats and its role in the pathogenesis of morphofunctional disorders that occur under the influence of heavy metal salts.

**Key words:** prostate, neuroendocrine system, chromogranin A, heavy metal salts.

**Corresponding author:** \*a.shkreba@mail.ru**Резюме****Шкрюба А.О.***Сумський державний  
університет,**вул. Римського-Корсакова, 2,  
Суми, 40007, Україна***ВПЛИВ СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА МОРФОГЕНЕЗ  
НЕЙРОЕНДОКРИННИХ КЛІТИН ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗА-  
ЛОЗИ**

Функція нейроендокринних клітин у передміхуровій залозі залишається мало вивченою. У зв'язку з цим надзвичайно важливими є дослідження нейроендокринного компоненту ПЗ та його ролі у розвитку патологічних станів простати, викликаних несприятливими чинниками зовнішнього середовища. У експерименті проведеному на 48 безпородних статевозрілих щурах-самцях вивчалися особливості структурної організації нейроендокринних клітин в нормі та в умовах впливу комбінації солей важких металів. Було виявлено, що під впливом комбінації солей важких металів відбувається збільшення популяції хромогранінсекретуючих нейрон

докринних клітин в тканині передміхурової залози піддослідних щурів. Проведене дослідження підтверджує захисну, адаптаційно-компенсаторну сутність перебудови нейроендокринної системи передміхурової залози щурів та її роль в патогенезі морфофункціональних порушень, які виникають в умовах впливу солей важких металів.

**Ключові слова:** передміхурова залоза, нейроендокринна система, хромогранін А, солі важких металів..

#### Резюме

**Шкрьоба А. А.**

*Сумський державний університет,  
ул. Римського-Корсакова, 2,  
Сумы, 40007, Україна*

#### ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА МОРФОГЕНЕЗ НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ КЛЕТОК ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Функция нейроэндокринных клеток в предстательной железе остается мало изученной. В связи с этим чрезвычайно важными являются исследования нейроэндокринного компонента предстательной железы и его роли в развитии патологических состояний простаты, вызванных неблагоприятными факторами внешней среды. В эксперименте проведенном на 48 беспородных половозрелых крысах-самцах изучались особенности структурной организации нейроэндокринных клеток в норме и в условиях влияния комбинации солей тяжелых металлов. Было выявлено, что под влиянием комбинации солей тяжелых металлов происходит увеличение популяции хромогранинсекретирующих нейроэндокринных клеток в ткани предстательной железы подопытных крыс. Проведенное исследование подтверждает защитную, адаптационно-компенсаторную сущность перестройки нейроэндокринной системы предстательной железы крыс и ее роль в патогенезе морфофункциональных нарушений, которые возникают в условиях влияния солей тяжелых металлов.

**Ключевые слова:** предстательная железа, нейроэндокринная система, хромогранин А, соли тяжелых металлов..

**Автор, відповідальний за листування:** \* a.shkreba@mail.ru

#### Вступ

За сучасними уявленнями, регуляція функцій передміхурової залози представляє собою складний процес, в якому пептидергічна регуляція має велике значення. До регуляторів функцій передміхурової залози (ПЗ) відносять широкий спектр фізіологічно активних гормонів і медіаторів, які продукуються клітинами дифузної нейроендокринної системи [1].

Нейроендокринні клітини (НЕ-клітини) уретро-простатичної області були вперше описані К. Pretl у 1944 році [2], та пізніше (в 1969 році) віднесені А. Pearse до клітин «APUD»-системи [3]. Нейроендокринні клітини передміхурової залози людини представлені двома типами клітин – відкритим та закритим. Обидва типи клітин мають цитоплазматичні дендритоподібні відростки, які контактують з клітинами залозистого епітелію та іншими нейроендокринними клітинами. Ці мікрроворсинки можуть досягати

ацинарних просвітів та виконувати роль рецепторів, таким чином беручи участь у регуляції простатичної секреції [4].

Хромогранін А (ХгА) є найважливішим маркером нейроендокринних клітин передміхурової залози. Він являє собою гідрофільний, кислий протеїн, який складається з 431-445 амінокислотних залишків і має молекулярну масу 49 кДа. Ген, який кодує ХгА у людини знаходиться в 14 хромосомі [5]. У результаті процесингу хромограніну А на більш дрібні молекули утворюються біологічно активні пептиди, такі як вазостатин, панкреастатин, катестатин та серпініни. Розуміння біологічної ролі хромограніну А та продуктів його процесингу почало зростати в останні роки [6]. Але, функція ХгА до цього часу чітко не встановлена [7]. Вважають, що ХгА можливо володіє екстрацелюлярним біологічним ефектом та діє як аутокринний і парак-



ринний регуляторний фактор у секреторних процесах.

До недавнього часу дослідження нейроендокринної системи передміхурової залози були малочисельні у порівнянні з літературою присвяченою НЕ-клітинам в інших органах. У зв'язку з розвитком імуноцитохімічних методик в останні роки число публікацій помітно збільшилося, проте дослідження простатичної нейроендокринної системи все ще знаходяться на самому початку [8]. Дослідження морфофункціональних особливостей нейроендокринної системи ПЗ в при різних патологічних процесах є поодинокими, а вплив важких металів на морфогенез НЕ-клітин у науковій літературі не відображений зовсім.

#### Матеріали і методи

Дослідження було проведено на 48 безпородних щурах-самцях віком 6 місяців (статевозрілі). Тварини були розподілені на дві групи: I - контрольна, II - тварини, які отримували дистильовану воду з комбінацією солей важких металів (цинку ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) - 5 мг/л, міді ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) - 1 мг/л, заліза ( $FeSO_4$ ) - 10 мг/л, марганцю ( $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ ) - 0,1 мг/л, свинцю ( $Pb(NO_3)_2$ ) - 0,1 мг/л, хрому ( $K_2Cr_2O_7$ ) - 0,1 мг/л). Тривалість експерименту склала 60 днів. Під час експерименту лабораторних тварин утримували відповідно до правил, прийнятих Європейською конвенцією із захисту хребетних тварин, яких використовують для експерименту і наукових завдань (Страсбург, 1986р), принципів Гельсінської декларації, прийнятої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації (1964-2000рр.), «Загальних етичних правил експериментів над тваринами», затверджених I Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Тканину передміхурової залози фіксували в розчині 10% нейтрального формаліну, заливали в парафін, зрізи товщиною 5 мкм виготовляли на ротатійному мікротомі. Гістологічні препарати, забарвлювали гематоксилином та еозином, проводили PAS-реакцію.

Для виявлення нейроендокринних клітин проводили імуногістохімічне дослідження з використанням кролячих моноклональних антитіл до хромограніну А. Продукти реакції виявляли за допомогою системи детекції UltraVision ONE

Detection System HRP Polymer. В якості хромогену використовували діамінобензидин. Зрізи дофарбовували гематоксилином.

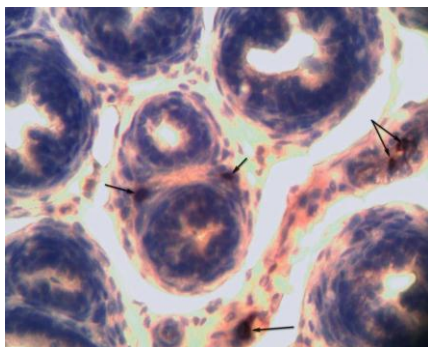
Оцінку експресії виявляли за допомогою розрахунку площі експресії (відношення площі імунопозитивних клітин до загальної площі усіх клітин виражене в процентах).

#### Результати дослідження

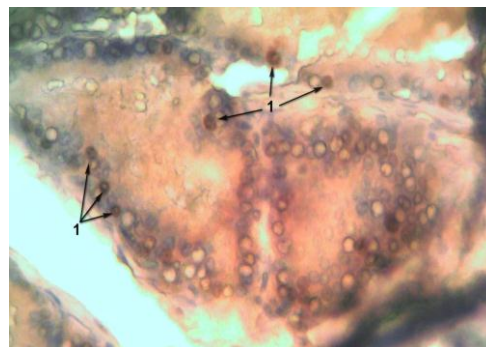
Нейроендокринні клітини імунореактивні до хромограніну А були виявлені в тканині ПЗ щурів обох груп. Вони найчастіше мали округлу, грушоподібну форму, рідше визначалися клітини циліндричної або трикутної форми. ХгА-позитивне фарбування виявлялося в цитоплазмі та клітинній стінці НЕ-клітин. У ПЗ статевозрілих щурів контрольної групи НЕ-клітини були розташовані рівномірно по всій залозі (рис. 1). Площа експресії ХгА майже не змінювалася на протязі всього терміну спостереження і склала  $5,54 \pm 0,03\%$ ,  $5,62 \pm 0,04\%$ ,  $5,47 \pm 0,07\%$  на 15, 30 та 60 добу експерименту відповідно. Це свідчить про сталість механізмів локальної та системної регуляції діяльності ПЗ на тлі стабілізації рівня андрогенів в організмі статевозрілих щурів.

На 15 добу впливу комбінації СВМ спостерігалася дифузна експресія ХгА у вигляді гранулярного фарбування цитоплазми. НЕ-клітини мали округлу форму та, головним чином, знаходилися між базальною мембраною та клітинами секреторного епітелію (рис. 2). У невеликій кількості хромогранінсекретуючі НЕ-клітини виявлялися навколо вивідних протоків та в міжацинарній стромі. Площа експресії ХгА в ПЗ статевозрілих щурів на 15 добу експерименту була більшою у порівнянні з групою інтактних тварин і становила  $5,87 \pm 0,05$  ( $p < 0,01$ )

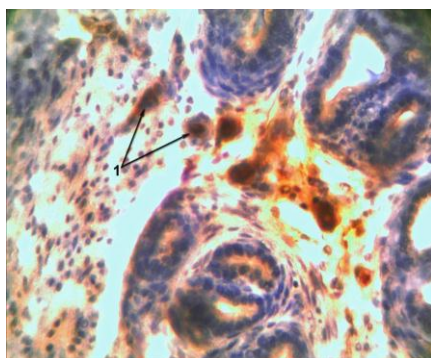
У тканині ПЗ статевозрілих щурів на 30 добу експерименту в НЕ-клітинах була виявлена інтенсивна цитоплазматична реакція, яка характеризувалася дифузним фарбуванням цитоплазми або відкладенням гранул у вигляді грубих плям. Найбільша кількість НЕ-клітин знаходилася навколо крупних вивідних протоків та ацинусів. Периацинарні НЕ-клітини були розташовані ізольовано або формували невеликі кластери (рис. 3). Спостерігалася поява популяції хромогранінсекретуючих НЕ-клітин у субкапсулярній зоні простати.



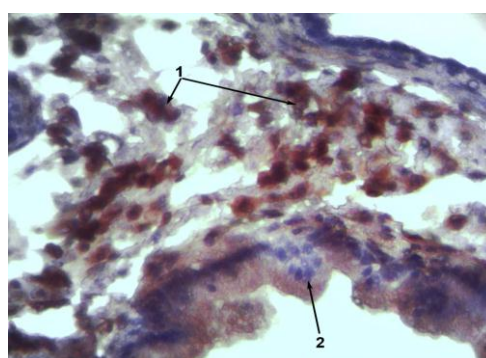
**Рис. 1.** Імуногістохімічне дослідження експресії ХгА у передміхуровій залозі статевозрілого щура. Контроль, 15 доба спостереження. Візуалізація діамінобензидином. Збільшення  $\times 360$ . Стрілками позначена позитивна реакція з цитоплазмою ендокриноцитів.



**Рис. 2.** Імуногістохімічне дослідження експресії ХгА у передміхуровій залозі статевозрілого щура. 15 доба впливу СВМ. Візуалізація діамінобензидином. Збільшення  $\times 360$ . 1 – округлі HE-клітини розташовані між секреторними епітеліоцитами ацинусів.



**Рис. 3.** Імуногістохімічне дослідження експресії ХгА у передміхуровій залозі статевозрілого щура. 30 доба впливу СВМ. Візуалізація діамінобензидином. Збільшення  $\times 400$ . 1 – HE-клітини з інтенсивно забарвленими цитоплазмою та клітинною стінкою.



**Рис.4.** Імуногістохімічне дослідження експресії ХгА у передміхуровій залозі статевозрілого щура. 60 доба впливу СВМ. Візуалізація діамінобензидином. Збільшення  $\times 400$ . 1 – чисельні HE-клітини з позитивною реакцією в цитоплазмі та клітинній стінці; 2 – ацинарний епітелій.

Площа експресії ХгА в тканині ПЗ статевозрілих щурів на 30 добу експерименту становить  $6,15 \pm 0,05\%$  ( $p < 0,01$ ), що на 9,43% більше у порівнянні з контролем. Через 60 днів впливу СВМ імуногістохімічна реакція на ХгА носила гранулярний тип з великим накопиченням ферменту в центральній частині HE-клітин. Кількість клітин значно зростає у порівнянні з попередніми термінами спостереження, вони утворюють дифузні скупчення, які знаходяться навколо кінцевих секреторних відділів та вивідних протоків (рис. 4). Частина HE-клітин була розташована між базальними клітинами ацинусів або в тісному контакті з кровоносними судинами. Така локалізація HE-клітин показує, що вони можуть виконувати роль посередників у стромально-паренхіматозних взаємодіях в умовах впливу на залозу несприятливих чинників.

Після 60 днів дослідження площа експресії ХгА збільшується на 15,36% порівняно з гру-

пою інтактних тварин і становить  $6,31 \pm 0,07\%$  ( $p < 0,01$ )

#### Обговорення результатів

У результаті проведеного імуногістохімічного дослідження виявлено, що під впливом комбінації СВМ відбувається збільшення популяції хромогранінсекретуючих HE-клітин у тканині ПЗ піддослідних щурів. Площа експресії ХгА в ПЗ тварин збільшувалася на протязі експерименту і була достовірно вище, у порівнянні з контрольною серією. Так, площа експресії ХгА статевонезрілих щурів, які отримували СВМ на 15, 30 та 60 добу експерименту у порівнянні з контролем збільшувалася на 5,96% ( $p < 0,01$ ), 9,43% ( $p < 0,01$ ) та 15,36% ( $p < 0,01$ ) відповідно.

Враховуючи гетерогенну морфологію і різноманіття продуктів секреції, нейроендокринні клітини, вірогідно, мають багато функцій. Внутрішні рецептори до глюкози плазми крові, кальцію, кисню та інших важливих для метаболізму

факторів пов'язані з дифузною нейроендокринною системою і регулюються через механізми накопичення та вивільнення хромограніну та продуктів його процесингу [5]. За аналогією з тим, що відомо відносно НЕ-клітин у дихальній, гастроінтестинальній системах і в підшлунковій залозі [9], НЕ-клітини необхідні для росту і диференціювання, а також для регулювання гомеостазу секреторних процесів у зрілій передміхуровій залозі.

Доведено, що ХгА та його продукти можуть стимулювати синтез оксиду азоту та простагландинів, інгібувати секрецію катехоламінів тим самим викликаючи вазодилатацію, що може відігравати роль у патогенезі захворювань ПЗ [6]. У дослідженнях окремих авторів було виявлено, що одною з ланок патогенезу судинних порушень при різних патологічних станах є дегрануляція НЕ-клітин з послідуочим виходом в міжклітинний простір біологічно активних пептидів [10].

Під впливом несприятливих факторів, зокрема дії на організм СВМ відбувається порушення регуляторних механізмів у ПЗ, що спри-

чиняє збільшення кількості НЕ-клітин, підвищення продукції ХгА. Активація нейроендокринної регуляції в тканині ПЗ спочатку призводить до певного відновлення гомеостазу – на 30 добу експерименту спостерігається часткове відновлення секреторної функції ПЗ, знижується активність процесів десквамації епітелію. В пізні терміни дослідження (60 доба) відбувається формування патологічно замкнутого процесу, що проявляється порушенням мікроциркуляції внаслідок вазодилатації та стази крові в судинах ПЗ, які виникають у результаті впливу біологічно активних пептидів НЕ-клітин. Порушення мікроциркуляції призводить до гіпоксії в тканині ПЗ, яка поглиблює патологічні зміни викликані впливом СВМ, а порушення гомеостазу ПЗ в свою чергу стимулює утворення нових НЕ-клітин. Таким чином, регуляторні пептиди і біогенні аміни НЕ-клітин можуть виконувати роль регуляторів нормального функціонування залози. З іншої сторони, ці речовини в тій чи іншій мірі приймають участь у патогенезі морфофункціональних порушень у ПЗ, які виникають під впливом СВМ.

#### Висновки

Отже, результати проведеного дослідження та літературні дані свідчать про те, що саме клітини дифузної нейроендокринної системи відіграють важливу роль в механізмі адаптації та розвитку дисфункцій ПЗ, які виникають в умовах впливу комбінації СВМ. В результаті проведеного імуногістохімічного дослідження виявлено, що під впливом комбінації солей важких металів відбувається збільшення популяції хромогранінсекретуючих нейроендокринних клітин в тканині передміхурової залози піддос-

лідних щурів. Секреція НЕ-клітинами вазоактивних з'єднань та їх локальне накопичення в тканині ПЗ призводить до мікроциркуляторних порушень, гіпоксії, розвитку метаболічного ацидозу та інших порушень обмінних процесів у різних клітинах, у тому числі – регуляторах гомеостазу. Кінцевим результатом таких змін є дезорганізація нейрогуморального регулювання функціональних параметрів ПЗ та судинної системи і формування патологічного кола, яке посилює первинні порушення спричинені впливом СВМ..

#### References (список літератури)

1. Santamaría, Luis, et al. *Neuroendocrine Cells and Peptidergic Innervation in Human and Rat Prostate*. Springer, 2007. 79 p.
2. Pred, K. Zur Frage der Endokrinie der menschlichen Vorsteherdruze. *Virchows Arch (Pathol Anat)*. 1944; 312: 392-404.
3. Pearse, A. G. E. The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1969; 17(5): 303-313.

4. Aumüller, Gerhard, et al. Neurogenic origin of human prostate endocrine cells. *Urology*. 1999; 53(5): 1041-1048.
5. Helle, Karen B. The granin family of uniquely acidic proteins of the diffuse neuroendocrine system: comparative and functional aspects. *Biological Reviews*. 2004; 79(04): 769-794.
6. Helle, K. B., et al. The endocrine role for chromogranin A: a prohormone for peptides with regulatory properties. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007; 64(22): 2863-2886.
7. Schmid-Schönbein, Daniel TO'Connor, and Sushil K. Mahata. Global metabolic consequences of the chromogranin. *J. Biol. Chem*. 2014; 289(7): 4455-4469.





8. D'amico, Maria Angela, et al. Biological function and clinical relevance of chromogranin A and derived peptides. *Endocrine connections*. 2014; 3(2): 45-54.
9. Toni, R. The neuroendocrine system: organization and homeostatic role. *Journal of endocrinological investigation*. 2003; 27(6): 35-47.

10. Raikhlin N.T., Kvetnoy I.M. The APUD system (diffuse endocrine system) in normal and pathological states. *Physiol. Gen. Biol. Rev.* 1994; 8(4): 1-44.

**(received 12.02.2014, published online 30.03.2015)**

**(отримано 12.02.2014, опубліковано 30.03.2015)**

